

Aktenzeichen: 199 23 784.0

München, den 1. Februar 2000  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole B 01 F und C 12 P der Internationalen Patentklassifikation erhalten.  
Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung ist auf die Cognis Deutschland GmbH in Düsseldorf/Deutschland umgeschrieben worden.  
am 25. Mai 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

"Verwendung von Mikroemulsionen in Fermentationsverfahren"

Die Henkel Kommanditgesellschaft auf Aktien in Düsseldorf/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

Bescheinigung



PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

WIPO	PCT
REC'D 19 JUL 2000	

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

199 23 784.0

## Verwendung von Mikroemulsionen in Fermentationsverfahren

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Mikroemulsionen in Fermentationsverfahren.

Bei der Synthese komplexer Naturstoffe oder sonstiger organischer Verbindungen, beispielsweise Antibiotika, werden zunehmend mikrobiologische Verfahren eingesetzt. Dabei handelt es sich um eine Stoffumwandlung unter anaeroben oder aeroben Bedingungen, bei der Mikroorganismen, oder Teile von Mikroorganismen, insbesondere aber Bakterien oder Pilze beteiligt sind. Für derartige Verfahren werden in der Fachwelt verschiedene, nicht immer klar voneinander abgegrenzte Ausdrücke, wie "Bioconversion", "Biotransformation" oder "Fermentation" verwendet. Der letztere Ausdruck wird auch im Rahmen der vorliegenden Anmeldung für solche Verfahren verwendet, bei denen Mikroorganismen, vorzugsweise Bakterien, zur Umwandlung bzw. Synthese von chemischen Verbindungen verwendet werden.

Für die Entwicklung und Optimierung von Fermentationsprozessen ist insbesondere das Reaktionsmedium, in dem die mikrobiologische Umwandlung stattfindet, von Bedeutung. Das Reaktionsmedium, in aller Regel eine wäßrige Lösung oder Dispersion, beeinflußt insbesondere die Ausbeute und Effizienz des Verfahrens. Die Mikroorganismen benötigen als Nährstoffe Kohlenstoff, Stickstoff und bestimmte Spurenelemente in gebundener Form, z.B. Calcium, Eisen, Phosphor oder Zink, um eine erfolgreiche Metabolisierung zu den gewünschten Produkten möglich zu machen. Weiterhin muß regelmäßig ein bestimmter, meistens enger Temperatur- und pH-Bereich eingehalten werden. Zu weiteren Einzelheiten sei hier auf das Lehrbuch von W. Crueger/A. Crueger, Biotechnologie - Lehrbuch der angewandten Mikrobiologie, 2. Auflage 1984, R. Oldenbourg Verlag, verwiesen. Insbesondere Kapitel 5 dieses Werkes beschäftigt sich mit den Grundlagen der Fermentationstechnik. Diese Literaturstelle gehört daher auch ausdrücklich zur Offenbarung der vorliegenden Anmeldung. Als Nährstoffe für die Mikroorganismen werden neben energiereichen Zuckern und deren Derivaten in vielen Verfahren zusätzlich natürliche Fette und Öle, sowie Derivate dieser Stoffklassen, wie Glycerin, Glyceride, Fettsäuren oder

Fettsäureester eingesetzt. Selbstverständlich dürfen die Kulturmedien keine Inhaltsstoffe aufweisen, die die Metabolisierung der Mikroorganismen negativ beeinflussen können.

Aus der DE 37 38 812 A1 ist beispielsweise ein mikrobielles Verfahren zur Herstellung von alpha-omega-Dicarbonsäuren bekannt, wobei Bakterien des Stammes *Candida tropicalis* Methyllaurat in die gewünschten Dicarbonsäuren umwandeln. Die Umwandlung findet in einem wäßrigen Medium bei einem pH-Wert von 6,0 und einer Temperatur von 30 °C statt. Das Medium enthält, neben den Mikroorganismen als Energielieferant Glucose, weiterhin als Emulgator ethoxyliertes Sorbitanmonoolat, Hefeextrakt, Maisquellwasser sowie anorganische N- und P-Quellen. Dem Medium wird dann das Methyllaurat zugesetzt. Der Schritt ist kein Hinweis auf den Emulsionstyp zu entnehmen, der sich im Fermenter ausbildet oder in der das Methyllaurat dem Medium zugesetzt wird. Aus der EP 0 535 939 A1 ist ein Verfahren zur Herstellung von omega-9-mehrfach ungesättigten Fettsäuren bekannt, wobei in einem wäßrigen Kulturmedium geeignete Mikroorganismen in Gegenwart von Zuckern als Energielieferanten und anorganischen oder organischen Stickstoffquellen, sowie in Gegenwart von Fettsäuremethylestern die gewünschten mehrfach ungesättigten Fettsäuren produzieren.

Es sind aber auch Verfahren bekannt, wo nur Fettstoffe der oben bezeichneten Art als Energielieferanten verwendet werden. Dies ist besonders von wirtschaftlichem Interesse, da derartige Fettstoffe in der Regel preiswerter sind als Zucker, Stärke und ähnliche Verbindungen. Park et al. beschreiben (Park et al., Journal of Fermentation and Bioengineering, Vol. 82, No. 2, 183-186, 1996) einen Fermentationsprozess zur Herstellung von Tylosin, bei dem Mikroorganismen des Stammes *Streptomyces fradiae* in einem wäßrigen Medium verwendet werden, daß als einzige Kohlenstoffquelle Rapsöl in Ausgangsmengen von etwa 60 g/l enthält.

Bei Fermentationsverfahren spielt außerdem der Sauerstoffgehalt im Medium bzw. der Fermentationsbrühe, eine entscheidende Rolle. Dabei kommt dem Sauerstoff bei aeroben Prozessen die Rolle eines Substrates zu. Entscheidend ist, ob ein für das jeweilige Verfahren ausreichender Sauerstoffübergang von der Gas- in die Flüssigphase, die die Mikroorganismen enthält, stattfinden kann. Ein wichtiger Parameter stellt die spezifische Austauschfläche dar, die in der Regel indirekt über den Sauerstoffübergangskoeffizienten  $k_L a$  bestimmt wird (vergl. Literaturstelle *Crueger*, Kapitel 5, Seite 71 ff). Die Einstellung des optimalen

Sauerstoffeintrags erfolgt typischerweise durch Rühren der Fermentationsbrühe, wobei der Sauerstoff bzw. die Luft mit der Flüssigkeit vermischt wird und so an den Grenzflächen der Gasaustausch stattfindet. Allerdings kann der erhebliche mechanische Energieeintrag durch starkes Rühren, wie Park et al. ausführen, auch Teile der Kultur zerstören, und so die Ausbeute des Verfahrens verringern. Die abgestorbenen Mikroorganismen werden außerdem selbst weiter abgebaut und können durch die gebildeten Abbauprodukte zu einer Vergiftung der Kultur führen, die eine wirtschaftliche Produktion unmöglich macht. Aus der Arbeit von Goma und Rols (G. Goma, J.L. Rols, Biotech. Let., Vol 13, No. 1, Seiten 7 bis 12, 1991) ist bekannt daß die Verwendung von Sojaöl in Fermentationsverfahren zur Herstellung von Antibiotika zu einer Verbesserung des Sauerstoffübergangskoeffizienten  $k_L a$  führt, was bei gleichem Energieeintrag (Rühren) zu einem Anstieg der Ausbeute des Gesamtverfahrens führen kann.

Der vorliegenden Erfindung lag nun die Aufgabe zugrunde, Fermentationsverfahren so zu verbessern, daß einerseits preiswerte Kohlenstoffquellen eingesetzt werden können und andererseits eine ausreichende Versorgung der Mikroorganismen mit Sauerstoff gewährleistet ist, ohne daß eine unzulässig hohe mechanische Belastung der Mikroorganismen durch Rühren auftritt. Es sollte eine Weg gefunden werden, den mechanischen Energieeintrag bei Fermentationsverfahren zu minimieren, ohne daß es zu einer Verringerung der Ausbeute kommt. Vorzugsweise soll eine Erhöhung der Ausbeute trotz verringertem Energieeintrag möglich sein.

Es wurde gefunden, daß die Verwendung von speziellen, feinteiligen Öl-in-Wasser (O/W) Emulsionen die obige Aufgabe löst.

In einer ersten Ausführungsform wird die Verwendung von O/W-Emulsionen in Fermentationsverfahren beansprucht, wobei diese Emulsionen mindestens Wasser, Emulgatoren sowie eine Ölphase enthalten und die Ölphase eine oder mehrere Verbindungen aus den Gruppen

- a) der Fettsäuremethylester und/oder
- b) der Triglycride pflanzlichen Ursprungs

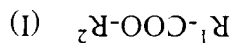
enthalten, wobei die Emulsionen eine Tröpfchengröße von 1 bis 50 nm aufweisen.

Die erfindungsgemäßen Emulsionen zeichnen sich insbesondere durch ihre Feinteiligkeit aus. Es handelt sich dabei um sogenannte Mikroemulsionen, die definiert sind als makroskopisch homogene, optisch transparente, häufig niedrigviskose, thermodynamisch stabile Mischungen aus zwei miteinander nicht mischbaren Flüssigkeiten und mindestens einem nichtionischen oder einem ionischen Tensid, das vorzugsweise zwei hydrophobe Reste enthält. Die Bildung einer Mikroemulsion bedingt eine Situation, bei der die Öl-Wasser-Grenzflächenspannung den Wert Null erreicht. In der Regel ist es notwendig, zusätzlich zu mindestens einem nichtionischen Tensid weitere Cotenside zuzusetzen, um diese spezielle Emulsionsform zu erreichen. Vergleiche hierzu die Literaturstelle "Introduction to Colloid and Surface Chemistry, D.J. Shaw, Butterworth, 1992, Seiten 269 und 270". Die Tröpfchengröße der erfindungsgemäß verwendeten Emulsionen beträgt 1 bis 50 nm. Vorzugsweise liegt die Tröpfchengröße im Bereich von 10 bis 50 nm, insbesondere im Bereich von 10 bis 30 nm. Die Feinteiligkeit der Öltröpfchen führt zu einer großen Oberfläche zwischen Öl- und Wasserphase und ermöglicht so einen schnellen Kontakt zwischen den in der wäßrigen Phase enthaltenen Mikroorganismen und der die Nährstoffe enthaltenden Ölphase. Durch die große Oberfläche wird auch der Gasaustausch, insbesondere von Sauerstoff und CO<sub>2</sub>, vereinfacht. Zusätzlich verringert sich die Viskosität der Emulsion und somit des gesamten Fermentationsmediums. In der Folge ist es daher möglich die Rührgeschwindigkeit des Fermentationsmediums deutlich zu verringern wodurch eine Erhöhung der Ausbeute des Fermentationsprozesses ermöglicht wird.

Die Mikroemulsionen werden erfindungsgemäß dem wäßrigen Fermentationsmedium, welches die Mikroorganismen sowie ggf. weitere Hilfs- und Zusatzstoffe enthält, zudosiert. Die Einzelheiten dieses Verfahrens, insbesondere die Geschwindigkeit und Menge der zudosierten Emulsion, ergeben sich aus der Art der Mikroorganismen und des gewählten Fermentationsverfahrens und können vom Fachmann an die spezifischen Gegebenheiten angepaßt werden.

Die Mikroemulsionen enthalten, neben Wasser, eine Ölphase, die Verbindungen aus der Gruppe der Fettsäuremethylester a) oder der nativen pflanzlichen Öle und deren Derivate b) enthält. Es handelt sich bei den Gruppen a) und b) um hydrophobe, in Wasser nicht oder nur sehr gering lösliche Verbindungen, die sowohl als Nährstoffe, also Energielieferanten, für die im Fermentationsprozeß eingesetzten Bakterien dienen können, die aber auch Ausgangsstoffe (Substrate) für die durch Bioconversion gewünschten Produkte darstellen können.

Geeignete Methylster der Gruppe a) leiten sich insbesondere ab von gesättigten, ungesättigten, linearen oder verzweigten Fettsäuren mit insgesamt 7 bis 23 Kohlenstoffatomen. Es handelt sich also um Verbindungen der Formel (I)



wobei  $R^1$  für einen Alkylrest mit 6 bis 22 C-Atomen steht und  $R^2$  ein Methylrest ist. Die Methylster der Formel (I) können auf übliche Weise erhalten werden, z.B. durch Umesterung von Triglyceriden mit Methanol und anschließender Destillation. Geeignete Fettsäuren sind die Capron-, Heptan-, Capryl-, Perlagon-, Caprin-, Undecan-, Laurin-, Tridecan-, Myristin-, Penta-decan-, Palmitin-, Heptadecan-, Stearin-, Nona-decan-, Arachin- und Behensäure. Ungesättigte Vertreter sind beispielsweise Lauroleïn-, Myristoleïn-, Palmitoleïn-, Petroselaïdin-, Öl-, Elaidin-, Ricinöl-, Linol-, Linolaïdin-, Linolen-, Gadoleïn-, Arachidon und Erucasäure. Auch Mischungen der Methylster dieser Säuren sind geeignet. Besonders bevorzugt ist die Verwendung solcher Mikroemulsionen, die Methylster aus der Gruppe Methylol-eal, Methylpamitat, Methylstearat und/oder Methylpelargonat enthalten. Es können aber auch Methylster auf Basis natürlicher Fettsäuremischungen "eingesetzt werden", wie sie beispielsweise aus Lein-, Kocos-, Palm-, Palmkern-, Oliven-, Ricinus-, Rüb-, Sesam-, Soja- oder Sonnenblumenöl (bei Raps- und Sonnenblumenöl jeweils neue und alte Züchtungen) erhalten werden.

Geeignete Verbindungen der Gruppe b) sind native Öle pflanzlichen Ursprungs. Es handelt sich dabei im Wesentlichen um Triglyceridmischungen, wobei das Glycerin mit längerkettingen Fettsäuren jeweils vollständig verestert ist. Besonders geeignete pflanzliche Öle sind ausgewählt aus der Gruppe Erdnuß-, Kocos-, Lein-, Palm-, Oliven-, Palmkern-, Ricinus-, Raps-, Sesam-, Soja- und Sonnenblumenöl.

Erdnußöl enthält durchschnittlich (bezogen auf Fettsäure) 54 Gew.-% Ölsäure, 24 Gew.-% Linolsäure, 1 Gew.-% Linolensäure, 1 Gew.-% Arachinsäure, 10 Gew.-% Palmitinsäure, sowie 4 Gew.-% Stearinsäure. Der Schmelzpunkt beträgt 2 bis 3 °C. Leinöl enthält typischerweise 5 Gew.-% Palmitin-, 4 Gew.-% Stearin-, 22 Gew.-% Öl-, 17 Gew.-% Linol- und 52 Gew.-% Linolensäure. Die Iodzahl liegt im Bereich von 155 bis 205. Die Verseifungszahl ist 188 bis 196 und der Schmelzpunkt liegt bei etwa - 20 °C.

Kokosöl enthält an Fettsäuren etwa 0,2 bis 1 Gew.-% Hexan-, 5 bis 8 Gew.-% Octan-, 6 bis 9 Gew.-% Decan-, 45 bis 51 Gew.-% Laurin-, 16 bis 19 Gew.-% Myristin-, 9 bis 11 Gew.-% Palmitin-, 2 bis 3 Gew.-% Stearin-, weniger als 0,5 Gew.-% Behen-, 8 bis 10 Gew.-% Öl- und bis 1 Gew.-% Linolsäure. Die Iodzahl liegt im Bereich von 7,5 bis 9,5, die Verseifungszahl liegt bei 0,88 bis 0,90. Der Schmelzpunkt liegt bei 20 bis 23 °C.

Oliveöl enthält überwiegend Ölsäure (vergl. Lebensmittelchem. Gerichtl. Chem., 39, 112 bis 114, 1985). Palmöl enthält als Fettsäurekomponenten etwa 2 Gew.-% Myristin-, 42 Gew.-% Palmitin-, 5 Gew.-% Stearin-, 41 Gew.-% Öl-, 10 Gew.-% Linolsäure. Palmkernöl ist typischerweise in Bezug auf das Fettsäurespektrum wie folgt zusammengesetzt: 9 Gew.-% Capron/Capryl/Caprin-, 50 Gew.-% Laurin-, 15 Gew.-% Myristin-, 7 Gew.-% Palmitin-, 2 Gew.-% Stearin-, 15 Gew.-% Öl- und 1 Gew.-% Linolsäure.

Rapsöl enthält als Fettsäurekomponenten typischerweise etwa 48 Gew.-% Erucasäure, 15 Gew.-% Ölsäure, 14 Gew.-% Linolsäure, 8 Gew.-% Linolensäure, 5 Gew.-% Icosensäure, 3 Gew.-% Palmitinsäure, 2 Gew.-% Hexadecensäure und 1 Gew.-% Docosadiensäure. Rapsöl aus neuer Züchtung ist bezüglich der ungesättigten Anteile angereichert. Typische Fettsäureanteile sind hier Erucasäure 0,5 Gew.-%, Ölsäure 63 Gew.-%, Linolsäure 20 Gew.-%, Linolensäure 9 Gew.-%, Icosensäure 1 Gew.-%, Palmitinsäure 4 Gew.-%, Hexadecensäure 2 Gew.-% und Docosadiensäure 1 Gew.-%.

Ricinusöl besteht zu 80 bis 85 Gew.-% aus dem Glycid der Ricinolsäure, daneben sind zu etwa 7 Gew.-% Glyceride der Öl-, zu 3 Gew.-% Glyceride der Linol- und zu etwa 2 Gew.-% die Glyceride der Palmitin- und der Stearinsäure enthalten.

Sojaöl enthält zu 55 bis 65 Gew.-% der Gesamtfettsäuren mehrfach ungesättigte Säuren, insbesondere Linol- und Linolensäure. Ähnlich ist die Situation beim Sonnenblumenöl, dessen typisches Fettsäurespektrum, bezogen auf Gesamtfettsäure wie folgt aussieht: ca. 1 Gew.-% Myristin-, 3 bis 10 Gew.-% Palmitin-, 14 bis 65 Gew.-% Öl- und 20 bis 75 Gew.-% Linolsäure.

Alle obigen Angaben über den Fettsäureanteil in den Triglyceriden sind bekanntermaßen abhängig von der Qualität der Rohstoffe und können daher zahlenmäßig schwanken. Besonders bevorzugt sind solche Mikroemulsionen, die Nährstoffe der Gruppe b), ausgewählt aus der Gruppe Kokosöl, Sonnenblumenöl und/oder Rapsöl enthalten.

Wichtige Bestandteile der erfindungsgemäß verwendeten Mikroemulsionen sind die eingesetzten Emulgatoren bzw. Emulgatorensysteme. Vorzugsweise werden als Emulgatoren nichtionische Emulgatoren, insbesondere ethoxylierte Fettalkohole und Fettsäuren eingesetzt.

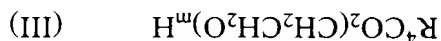
Fettalkoholethoxylate im Sinne der erfindungsgemäßen Lehre folgen der allgemeinen Formel (II)



wobei  $R^3$  für einen linearen oder verzweigten, gesättigten oder ungesättigten Alkylrest mit 6 bis 24 Kohlenstoffatomen steht und  $n$  eine Zahl von 1 bis 50 bedeutet. Besonders bevorzugt sind solche Verbindungen der Formel (II), in der  $n$  für eine Zahl von 1 bis 35 und insbesondere von 1 bis 15 steht. Besonders bevorzugt sind weiterhin solche Verbindungen der Formel (II), in der  $R^3$  für einen Alkylrest mit 16 bis 22 Kohlenstoffatomen steht.

Die Verbindungen der Formel (II) werden in an sich bekannter Weise durch Umsetzung von Fettalkoholen mit Ethylenoxid unter Druck, ggf. in Gegenwart saurer oder basischer Katalysatoren erhalten. Typische Beispiele sind Capronalkohol, Caprylalkohol, 2-Ethylhexylalkohol, Caprinalalkohol, Laurylalkohol, Isotridecylalkohol, Myristylalkohol, Cetylalkohol, Palmoleylalkohol, Stearylalkohol, Isostearylalkohol, Oleylalkohol, Elaidylalkohol, Petroselinylalkohol, Linolylalkohol, Linolenylalkohol, Elaeostearylalkohol, Arachylalkohol, Gadoleylalkohol, Behenylalkohol, Erucylalkohol und Brassidylalkohol sowie deren technische Mischungen, die z.B. bei der Hochdruckhydrierung von technischen Methylestern auf Basis von Fetten und Ölen oder Aldehyden aus der Roelen'schen Oxosynthese sowie als Monomertfraktion bei der Dimerisierung von ungesättigten Fettalkoholen anfallen. Bevorzugt sind technische Fettalkohole mit 12 bis 18 Kohlenstoffatomen, wie beispielsweise Kokos-, Palm-, Palmkern- oder Talgfettalkohol.

Fettsäureethoxylate, die ebenfalls als Emulgator oder Emulgatorkomponente in Betracht kommen, folgen vorzugsweise der Formel (III),



in der  $R^4$  für einen linearen oder verzweigten Alkylrest mit 12 bis 22 Kohlenstoffatomen und für Zahlen von 5 bis 50 und vorzugsweise 15 bis 35 steht. Typische Beispiele sind Anlagerungsprodukte von 20 bis 30 Mol Ethylenoxid an Laurinsäure, Isotridecansäure, Myristinsäure, Palmitinsäure, Palmoleinsäure, Stearinsäure, Isosteearinsäure, Ölsäure,



Elaidinsäure, Petroselininsäure, Linolensäure, Linolensäure, Elaeostearinsäure, Arachinsäure, Gadoleinsäure, Behensäure und Erucasäure sowie deren technische Mischungen, die z.B. bei der Druckspaltung von natürlichen Fetten und Ölen oder bei der Reduktion von Aldehyden aus der Roelen'schen Oxosynthese anfallen. Vorzugsweise werden Anlagerungsprodukte von 20 bis 30 Mol Ethylenoxid an Fettsäuren mit 16 bis 18 Kohlenstoffatomen eingesetzt.

Partialglyceride, die ebenfalls als Emulgatoren in Betracht kommen, folgen vorzugsweise der Formel (IV),



in der CO R<sup>5</sup> für einen linearen oder verzweigten Acylrest mit 12 bis 22 Kohlenstoffatomen und x, y und z in Summe für 0 oder für Zahlen von 1 bis 50, vorzugsweise 15 bis 35 steht. Typische Beispiele für im Sinne der Erfindung geeignete Partialglyceride sind Laurin-säuremonoglycerid, Kokosfett-säuremonoglycerid, Palmitinsäuremonoglycerid, Stearinsäuremonoglycerid, Isoste-arinsäuremonoglycerid, Ölsäuremonoglycerid und Talgfettsäuremonoglycerid sowie deren Addukte mit 5 bis 50 und vorzugsweise 20 bis 30 Mol Ethylenoxid. Vorzugsweise werden Monoglyceride bzw. technische Mono/Diglyceridgemische mit überwiegendem Monoglyceridanteil der Formel (IV) ein-gesetzt, in der CO R<sup>5</sup> für einen linearen Acylrest mit 16 bis 18 Kohlenstoffatomen steht.

Als weitere geeignete Emulgatoren kommen beispielsweise nichtionogene Tenside aus einer der folgenden Gruppen in Frage:

- (I) Anlagerungsprodukte von 2 bis 30 Mol Ethylenoxid und/ oder 0 bis 5 Mol Propylenoxid an lineare Fettalkohole mit 8 bis 22 C-Atomen;
- (II) Glycerinmono- und -diester und Sorbitanmono- und -diester von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren mit 6 bis 22 Kohlenstoffatomen und deren Ethylenoxidanlagerungsprodukte;
- (III) Alkylmono- und -oligoglycoside mit 8 bis 22 Kohlenstoffatomen im Alkylrest und deren ethoxylierte Analoga;

(IV) Anlagerungsprodukte von 15 bis 60 Mol Ethylenoxid an Ricinusöl und/oder gehärtetes Ricinusöl;

(V) Polyol- und insbesondere Polyglycerinpolyricinoleat oder Polyglycerinpoly-12-hydroxystearat. Ebenfalls geeignet sind Gemische von Verbindungen aus mehreren dieser Substanzklassen;

(VI) Anlagerungsprodukte von 2 bis 15 Mol Ethylenoxid an Ricinusöl und/oder gehärtetes Ricinusöl;

(VII) Partialester auf Basis linearer, verzweigter, ungesättigter bzw. gesättigter C<sub>12/22</sub>-Fettsäuren, Ricinolsäure sowie 12-Hydroxystearinsäure und Glycerin, Polyglycerin, Pentaerythrit, Dipentaerythrit, Zuckeralkohole (z.B. Sorbit) sowie Polyglucoside (z.B. Cellulose);

(VIII) Wollwachsalkohole;  
(IX) Polyalkylenglycole.

Die Anlagerungsprodukte von Ethylenoxid und/oder von Propylenoxid an Glycerinmono- und -diester sowie Sorbitanmono- und -diester von Fettsäuren oder an Ricinusöl stellen bekannte, im Handel erhältliche Produkte dar. Es handelt sich dabei um Homologengemische, deren mittlerer Alkoxylierungsgrad dem Verhältnis der Stoffmengen von Ethylenoxid und/oder Propylenoxid und Substrat, mit denen die Anlagerungsreaktion durchgeführt wird, entspricht.

Besonders bevorzugt ist die Mitverwendung von Emulgatoren der Gruppe (III), also der Alkylglycoside, Alkyl- und Alkenyloligoglykoside stellen bekannte nichtionische Tenside dar, die der Formel (V) folgen,



in der R<sup>6</sup> für einen Alkyl- und/oder Alkenylrest mit 4 bis 22 Kohlenstoffatomen, G für einen Zuckerrest mit 5 oder 6 Kohlenstoffatomen und p für Zahlen von 1 bis 10 steht. Sie können nach den einschlägigen Verfahren der präparativen organischen Chemie erhalten werden. Stellvertretend für das umfangreiche Schrifttum sei hier auf die Übersichtsarbeit von Biermann et al. in Starch/Stärke 45, 281 (1993), B.Salka in Cosm. Toil. 108, 89 (1993) sowie J.Kahre et al. in SÖFW-Journal Heft 8, 598 (1995) verwiesen.

Die Alkyl- und/oder Alkenyloligoglykoside können sich von Aldosen bzw. Ketosen mit 5 oder 6 Kohlenstoffatomen, vorzugsweise der Glucose ableiten. Die bevorzugten Alkyl- und/oder Alkenyloligoglykoside sind somit Alkyl- und/oder Alkenyloligoglykoside. Die Indexzahl p in der allgemeinen Formel (V) gibt den Oligomerisierungsgrad (DP), d. h. die Verteilung von Mono- und Oligoglykosiden an und steht für eine Zahl zwischen 1 und 10. Während p in einer gegebenen Verbindung stets ganzzahlig sein muß und hier vor allem die Werte  $p = 1$  bis 6 annehmen kann, ist der Wert p für ein bestimmtes Alkyloligoglykosid eine analytisch ermittelte rechnerische Größe, die meistens eine gebrochene Zahl darstellt. Vorzugsweise werden Alkyl- und/oder Alkenyloligoglykoside mit einem mittleren Oligomerisierungsgrad p von 1,1 bis 3,0 eingesetzt. Aus anwendungstechnischer Sicht sind solche Alkyl- und/oder Alkenyloligoglykoside bevorzugt, deren Oligomerisierungsgrad kleiner als 1,7 ist und insbesondere zwischen 1,2 und 1,4 liegt. Der Alkyl- bzw. Alkenylrest  $R^6$  kann sich von primären Alkoholen mit 4 bis 11, vorzugsweise 8 bis 10 Kohlenstoffatomen ableiten. Typische Beispiele sind Butanol, Capronalkohol, Caprylalkohol, Caprinalalkohol und Undecylalkohol sowie deren technische Mischungen, wie sie beispielsweise bei der Hydrierung von technischen Fettsäuremethylestern oder im Verlauf der Hydrierung von Aldehyden aus der Roelen'schen Oxosynthese erhalten werden. Bevorzugt sind Alkyloligoglykoside der Kettenlänge  $C_8-C_{10}$  ( $DP = 1$  bis 3), die als Vorlauf bei der destillativen Auftrennung von technischem  $C_8-C_{18}$ -Kokosfettalkohol anfallen und mit einem Anteil von weniger als 6 Gew.-%  $C_{12}$ -Alkohol verunreinigt sein können sowie Alkyloligoglykoside auf Basis technischer  $C_{9/11}$ -Oxo-alkohole ( $DP = 1$  bis 3). Der Alkyl- bzw. Alkenylrest  $R^6$  kann sich ferner auch von primären Alkoholen mit 12 bis 22, vorzugsweise 12 bis 14 Kohlenstoffatomen, ableiten. Typische Beispiele sind Laurylalkohol, Myristylalkohol, Cetylalkohol, Palmoleylalkohol, Stearylalkohol, Isostearylalkohol, Oleylalkohol, Elaidylalkohol, Petroselinylalkohol, Arachylalkohol, Gadoleylalkohol, Behenylalkohol, Erucylalkohol, Brassidylalkohol sowie deren technische Gemische, die wie oben beschrieben erhalten werden können. Bevorzugt sind Alkyloligoglykoside auf Basis von gehärtetem  $C_{12/14}$ -Kokosalcohol mit einem DP von 1 bis 3. Werden Alkylglycoside der Formel (V) als Emulgatoren verwendet, kann es vorteilhaft sein, geringe Mengen an Polyhydroxycarbonensäuren, vorzugsweise Zitronensäure, als Formulierungshilfsstoffe mit zu verwenden. Üblicherweise werde dann die Polyhydroxysäuren in Mengen von 0,1 bis 3,0 Gew.-% verwendet, vorzugsweise in Mengen von 0,1 bis 1,0 Gew.-%.

Die erfindungsgemäß verwendeten Mikroemulsionen enthalten vorzugsweise von 20 bis 90 Gew.-% Wasser, insbesondere von 30 bis 80 Gew.-% und ganz besonders bevorzugt von 30 bis 60 Gew.-%. Der Rest auf 100 Gew.-% entfällt auf die Ölphase sowie Emulgatoren und ggf. weitere Hilfs- und Zusatzstoffe. Die Ölphase selbst ist vorzugsweise in Mengen von 10 bis 80 Gew.-%, insbesondere von 30 bis 70 Gew.-% und insbesondere von 30 bis 60 Gew.-% enthalten. Dabei enthält die Ölphase vorzugsweise ausschließlich die Komponenten a) oder b) bzw. Mischungen dieser Komponenten. Besonders bevorzugt ist die Verwendung solcher Emulsionen, die Öl- und Wasserphase im Gewichtsverhältnis von 1 : 1 enthalten. Die Emulgatoren, bzw. Emulgatorsysteme sind vorzugsweise in Mengen von 10 bis 50 Gew.-%, insbesondere in Mengen von 15 bis 40 Gew.-% und besonders bevorzugt in Mengen von 20 bis 35 Gew.-% enthalten.

Die beschriebenen Mikroemulsionen können erfindungsgemäß in Fermentationsprozessen aller Art eingesetzt werden. Dabei können alle dem Fachmann bekannten Verfahrensausgestaltungen, z.B. Batch- oder Fed-Batch sowie kontinuierliche Fermentation verwendet werden. Auch sind alle dem Fachmann bekannten Fermentersysteme einsetzbar. Zu den Einzelheiten siehe *Crueger*, Seiten 50 bis 70. Die Verwendung der Mikroemulsionen ist auch nicht auf bestimmte Mikroorganismen begrenzt, vielmehr lassen sich die Emulsionen zur Herstellung oder Umwandlung aller dem Fachmann durch Fermentation bekannten Verbindungen einsetzen. Neben den klassischen Fermentationsverfahren, die überwiegend zu Synthese von Antibiotika eingesetzt werden, (vergl. *a.a.O. Crueger*, Seiten 197 bis 242) eignen sich die beschriebenen Emulsionen aber auch zum Einsatz bei mikrobiellen Transformationen ("Bioconversion"), z.B. der Transformation von Steroiden und Sterinen, von Antibiotika und Pestiziden oder der Herstellung von Vitaminen (vergl. *Crueger*, Seiten 254 bis 273). Bevorzugt ist aber die Verwendung in Fermentationsprozessen zur Herstellung von Antibiotika, beispielsweise Cephalosporinen, Tylosin oder Erythromycin.

In der Regel werden die Mikroemulsionen der wäßrigen Fermentationsbrühe, welche die Mikroorganismen sowie die Stickstoffquelle und Spurenelemente und ggf. weitere Hilfsstoffe, insbesondere Entschäumer, enthält, in geeigneter Weise zudosiert. Als Stickstoffquellen kommen beispielsweise in Betracht: Pepton, Hefe- oder Malzextrakt, Maisquellwasser, Harnstoff oder Lecithine. Die Spurenelemente können in Form anorganischer Salze anwesend sein, beispielsweise Natrium- oder Kaliumnitrat, Ammoniumnitrat,

Henkel KGaA  
Dr. Reinhardt/BV  
21.05.1999

Ammoniumsulfat, Eisensulfat etc. Es kann auch vorteilhaft sein, den Mikroemulsionen selbst weitere Zusatzstoffe, wie Entschäumer oder Stickstoffquellen zuzusetzen.

# Beispiele

Es wurden verschiedene Mikroemulsionen durch Mischen der Ausgangsstoffe hergestellt. Die Zusammensetzungen sind in Tabelle 1 aufgeführt. Die Tröpfchengröße wurde mit einem Coulter N4 Plus Submicron Particle Sizer gemessen. Der Meßwinkel betrug 90°. Die Emulsionen eignen sich beispielsweise als alleinige Nährstoffquelle für Fermentationsprozessen und können direkt der wäßrigen Fermentationsbrühe zugesetzt werden.

Tabelle 1a

	Gew.-%	Gew.-%	Gew.-%	Gew.-%
Methylolaurat				32,44
Methylpelargonat		30,95		
Rubölfettsäuremethylester	32,35		29,61	
Wasser	34,27	32,04	30,24	34,18
Alkylglycosid	25,22	31,55	30,95	25,3
Glycerinoleat	7,91	6,55	7,62	7,84
Zitronensäure	0,25	0,24	0,24	0,24
Aussehen	klar	klar	klar	klar
Tröpfchengröße	< 50 nm	< 50 nm	< 50 nm	< 50 nm

## Patentansprüche

1. Verwendung von O/W-Emulsionen, enthaltend mindestens Wasser, Emulgatoren sowie eine Ölpfase, die eine oder mehrere Verbindungen, ausgewählt aus den Gruppen

a) der Fettsäuremethylester und/oder

b) der Triglyceride pflanzlichen Ursprungs

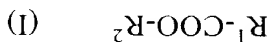
enthält, dadurch gekennzeichnet, daß die Emulsion eine Tropfchengröße im Bereich von 1 bis 50 nm aufweist, in Fermentationsverfahren.

2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Emulsionen verwendet werden, die eine mittlere Tropfchengröße im Bereich von 10 bis 50 nm, vorzugsweise 10 bis 30 nm aufweisen.

3. Verwendung nach den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß Emulsionen verwendet werden, die Wasser in Mengen von 20 bis 90 Gew.-%, vorzugsweise von 30 bis 80 Gew.-% und insbesondere von 30 bis 60 Gew.-% enthalten.

4. Verwendung nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß Emulsionen verwendet werden, welche die Ölpfase in Mengen von 10 bis 80 Gew.-%, vorzugsweise 30 bis 70 Gew.-% und insbesondere von 30 bis 60 Gew.-% enthalten.

5. Verwendung nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß Emulsionen verwendet werden, die in der Ölpfase Fettsäuremethylester der Formel (I) enthalten,



wobei  $\text{R}^1$  für eine Alkylrest mit 6 bis 22 C-Atomen steht und  $\text{R}^2$  einen Methylrest bedeutet.

6. Verwendung nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß Emulsionen verwendet werden, die in der Ölphase Methylolaurat, Methylpalmitat, Methylstearat und/oder Methylpelargonat enthalten.

7. Verwendung nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß Emulsionen verwendet werden, die in der Ölphase Kokos-, Sonnenblumen- und/oder Rapsöl enthalten.

8. Verwendung nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß Emulsionen verwendet werden, die als Emulgatoren Alkyloliglycoside enthalten.

9. Verwendung nach den Ansprüchen 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß Emulsionen verwendet werden, die 20 bis 90 Gew.-% und vorzugsweise 30 bis 80 Gew.-% und insbesondere 30 bis 60 Gew.-% Wasser enthalten.

10. Verwendung nach den Ansprüchen 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß Emulsionen verwendet werden, die Emulgatoren in Mengen von 10 bis 50 Gew.-%, vorzugsweise in Mengen von 15 bis 40 Gew.-% und insbesondere in Mengen von 20 bis 35 Gew.-% enthalten.



## **Zusammenfassung**

Verwendung von O/W-Emulsionen, enthaltend mindestens Wasser, Emulgatoren sowie eine Ölpfase, die einen oder mehrere Verbindungen enthält, ausgewählt aus den Gruppen

a) der Fettsäuremethylester und/oder

b) der Triglyceride pflanzlichen Ursprungs

wobei die Emulsionen eine mittlere Tröpfchengröße im Bereich von 1 bis 50 nm aufweisen, in Fermentationsverfahren.

